

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Freiburg i. Brsg.

Direktor: Professor Dr. H.U. Zollinger

Autoradiographische Untersuchungen zur DNS- und RNS-Synthese
an bioptisch entnommenem menschlichem Gewebe bei chronischer
Bronchitis und Bronchialcarcinom.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

einer

H o h e n M e d i z i n i s c h e n F a k u l t ä t

der

Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Brsg.

vorgelegt

von

Ursula Reich, geb. Ernst

geboren in

Stettin

1966

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Freiburg i. Brsg.

Direktor: Professor Dr. H.U. Zollinger

Autoradiographische Untersuchungen zur DNS- und RNS-Synthese
an biotisch entnommenem menschlichem Gewebe bei chronischer
Bronchitis und Bronchialcarcinom.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

einer

H o h e n M e d i z i n i s c h e n F a k u l t ä t

der

Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Brsg.

vorgelegt

von

Ursula Reich, geb. Ernst

geboren in

Stettin

1966



Dekan: Prof. Dr. H.U. Zollinger

Referent: Prof. Dr. W. Oehlert

Die Inkubationsmethode für autoradiographische Untersuchungen zur DNS- und RNS-Synthese an biotisch entnommenem menschlichem Gewebe bei chronischer Bronchitis und Bronchialcarcinom.

Einleitung:

In einer Reihe von autoradiographischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass im menschlichen Excisionsmaterial aus der Haut, dem Bronchialsystem und dem weiblichen Genitaltrakt nach kurzzeitiger Inkubation mit Eiweiss- oder Nucleinsäurevorläufern ein Einbau in Proteine und Nucleinsäuren erfolgt, dessen Ausmass als Maßstab für die in vivo ablaufenden Stoffwechselprozesse genommen werden kann (OEHLERT, LESCH u. DOERMER (1963) ; LESCH, SCHIESSLE u. OEHLERT (1964) ; FETTIG u. OEHLERT (1964)). Von systematisch durchgeführten Untersuchungen, in denen jeweils neben der Routinehistologie der Einbau von ^3H -Thymidin und ^3H -Cytidin autoradiographisch bestimmt wurde, liegen nun so umfangreiche Ergebnisse vor, dass Grenzen und Möglichkeiten der Inkubationsmethode zu überblicken sind.

Material und Methode.

Bisher wurden insgesamt 196 Biopsiepräparate von 110 Patienten nach 30 Minuten Inkubation in ^3H -Cytidin oder (und) ^3H -Thymidin autoradiographisch untersucht. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei den regenerativen Prozessen und Metaplasien bei chronischer Bronchitis und den Tumoren gewidmet. Wie Tab. 1 erkennen lässt, machten die chronischen Bronchitiden neben den Tumoren den Hauptteil der überhaupt untersuchten pathologischen Veränderungen im Respirations-trakt aus.

Tab. 1. Autoradiographisch untersuchtes Biopsiematerial bei 110 Patienten mit verschiedenen endothorakalen Krankheiten, unterteilt nach dem histologischen Befund.

Histologischer Befund	Anzahl der Pa- tienten	Anzahl der Biop- sien
Unspezifische Bronchitis	58	75
Nichtverhornendes Plattenepithelcarcinom	16	36
Verhornendes Plattenepithelcarcinom	8	18
Kleinzelliges Bronchialcarcinom	11	29
Adenocarcinom	4	6
Fibrosarkom	1	2
Retikulumzellsarkom	1	2
Tuberkulose	3	5
Sarkoidose	7	20
Amyloidose	1	3
Total	110	196

Die Inkubation ging folgendermassen vor sich:

Jeweils eine Stunde vor Beginn der Bronchoskopie wurden die Inkubationslösungen frisch bereitet. Sie bestanden aus normaler Ringerlösung (NaCl 8,0, KCl 0,2, Ca Cl₂ 0,2, NaHCO₃ 1,0, Aquadest ad 1000,0), der zur Markierung der Nucleinsäurevorläufer von DNS einmal 4 μ Ci Thymidin pro ml, zur Markierung derselben von RNS dagegen 4 μ Ci Cytidin pro ml zugesetzt worden war.

Jede der Inkubationslösungen wurde auf 4 Fläschchen mit jeweils 3 ml verteilt, entsprechend beschriftet und mit wasserdichten Plastikstöpseln verschlossen. Nun wurden die Gläschen im Wasserbad auf 37° erwärmt und in einer mit Wasser von 37° gefüllten strahlensicheren Thermoskanne auf dieser Temperatur gehalten. Zur Fixierung der Gläschen war für die Kanne ein Einsatz gefertigt worden.

Die dem Patienten mit OP entnommenen Gewebsbröckel oder durch Katheterbiopsie gewonnene Schleim- und Gewebsanteile wurden unmittelbar in sterile Ringerlösung von Körpertemperatur gebracht. Mittels einer feinen Schere wurden sie darin in zwei Teilchen zerschnitten, wovon eines zur Markierung in die ³H-Thymidin-, das andere in die ³H-Cytidinlösung gebracht wurde. Somit erfuhr jedes Excisionsstückchen Markierung mit beiden Inkubationslösungen. Die Inkubationszeit betrug jeweils 30 Minuten. Jede Lösung wurde höchstens zwei mal verwendet. Anschliessend kamen die Excisionsstückchen in vorbereitete Fläschchen mit 4 % neutralem gepuffertem Formalin, wo sie für 24 Stunden zur Fixation verblieben. Danach machten sie ohne vorherige Wässerung die langsam von 80 nach 99 % steigende Alkoholreihe durch, um anschliessend für etwa 12 Stunden in flüssiges Paraffin eingebettet zu werden. Die nun gefertigten Schnitte kamen in eine Streckwasserlösung von 34- 38° in einem Bad mit automatischer Temperatureinstellung, von wo aus von jeder Gewebsprobe jeweils 5 Schnitte

auf 5 Objektträger aufgezogen wurden.

Mittels der Dipping-Methode wurden die Gewebsschnitte unter Verwendung der Emulsion G 5, die besonders zur Ermittlung der Anzahl markierter Zellen benutzt wird, zu Autoradiogrammen verarbeitet.

Nach 5-10 Tagen Belichtungszeit erfolgte die photographische Entwicklung für 20 Minuten, und 40 Minuten Fixierung im Fixierbad. Zur Vermeidung von Schrumpfungen wurden die Schnitte nach einstündiger Wässerung sofort mit HE gefärbt, was nicht vor dem Entwicklungsprozess gemacht wurde, da die Färbungen leicht ausgebleicht werden. Es erfolgte nun die Auswertung der Autoradiogramme.

Ergebnisse:

Wir verzichten auf die Beschreibung einzelner Fälle und auf die vor allem für den Kliniker interessanten Vergleiche zwischen bronchoskopischem Bild, histologischem Schnitt und Autoradiogramm und beschränken uns auf die Beschreibung einzelner Autoradiogramme, welche die Grenzen und die Möglichkeiten der Methode besonders eindrucksvoll zu demonstrieren vermögen.

Etwa 70 % der angefertigten Präparate waren für eine qualitative und nur etwa 40 % für eine quantitative Auswertung durch Zellzählungen brauchbar. In etwa 30 % der Autoradiogramme war eine Markierung, d.h. ein Einbau der markierten Nucleinsäurevorläufer in DNS oder RNS, der untersuchten Zellen nicht nachweisbar. Dabei handelte es sich fast immer um Präparate, in denen Schnitte besonders grosser Gewebsbröckel zur Untersuchung gekommen waren. Wir haben Grund zu der Annahme, dass hierbei nicht etwa autolytische Veränderungen oder eine Schädigung der Gewebe für das negative Autoradiogramm verantwortlich zu machen sind, sondern dass bei der Aufarbeitung der Gewebstücke diejenigen Gewebsteile, die mit der Inkubationslösung in Kontakt waren, nicht im Schnitt erfasst wurden.

Ebenfalls bei grossen Gewebsbröckeln fanden wir eine derart schmale Zone markierter Zellen in der Gewebesperipherie, dass Zellzählungen zur Ermittlung des Markierungsindex (Zahl markierter Zellen: Gesamtzellzahl) nicht möglich waren. Die Eindringtiefe des Inkubationsmediums betrug etwa 200-300 μ , sie war um so grösser, je lockerer die untersuchten Gewebe aufgebaut waren. So war z.B. die Eindringtiefe bei kleinzelligen Bronchialcarcinomen mit ihren locker liegenden einzelnen Zellelementen weit grösser als bei den

soliden und festgefügtten Zellsträngen nichtverhornender oder verhornender Pflasterzellcarcinome. Besonders gute Einbau- und Auswertungsergebnisse hatten wir auch bei langen schmalen Streifen normalen oder krankhaft veränderten Bronchialepithels, denen nur schmale Bindegewebsstreifen anhafteten.

Das Markierungsmuster der Gewebe und Zellen bei den Inkubationsversuchen entsprach in jeder Hinsicht demjenigen, das wir nach parenteraler Applikation von ^3H -Thymidin oder ^3H -Cytidin im Tierversuch zu sehen gewohnt sind (OEHLERT, LESCH u. DOERMER (1963)). So fanden wir nach Inkubation mit ^3H -Thymidin, dem DNS-Vorläufer, in den untersuchten Geweben einzelne markierte Zellen, deren Zahl nur einen kleinen Bruchteil der Gesamtzellzahl ausmachte. Die autoradiographische Schwärzung war dabei ausschliesslich auf den Zellkern der entsprechenden Zellen beschränkt, wobei bei günstiger Schnittebene der Nucleolus als heller Fleck innerhalb des mit Silberkörnern bedeckten übrigen Karyoplasmas imponierte (Abb. 1). Alle im histologischen Schnitt erkennbaren Mitosefiguren waren bei der Inkubationszeit von 30 Minuten unmarkiert. Nach Inkubation mit ^3H -Cytidin, das vorwiegend in die RNS eingebaut wird, beobachteten wir eine Markierung aller Zellen im Bereiche der Eindringtiefe des Inkubationsmediums, wobei allerdings die Silberkorndichte über verschiedenen Zellarten auch ein und desselben Präparates unterschiedlich war. Bei der von uns gewählten Inkubationszeit von 30 Minuten war nur der Zellkern mit Silberkörnern bedeckt, wobei jedoch im Gegensatz zur Thymidinmarkierung die Silberkorndichte über dem Nucleolus grösser als über dem übrigen Kernraum war (Abb. 2). Alle im Schnitt getroffenen Meta- und Anaphasen der sich teilenden Zellen waren unmarkiert, wogegen einzelne Pro- und Telophasen mit geringer Silberkornzahl markiert waren (Abb. 3).

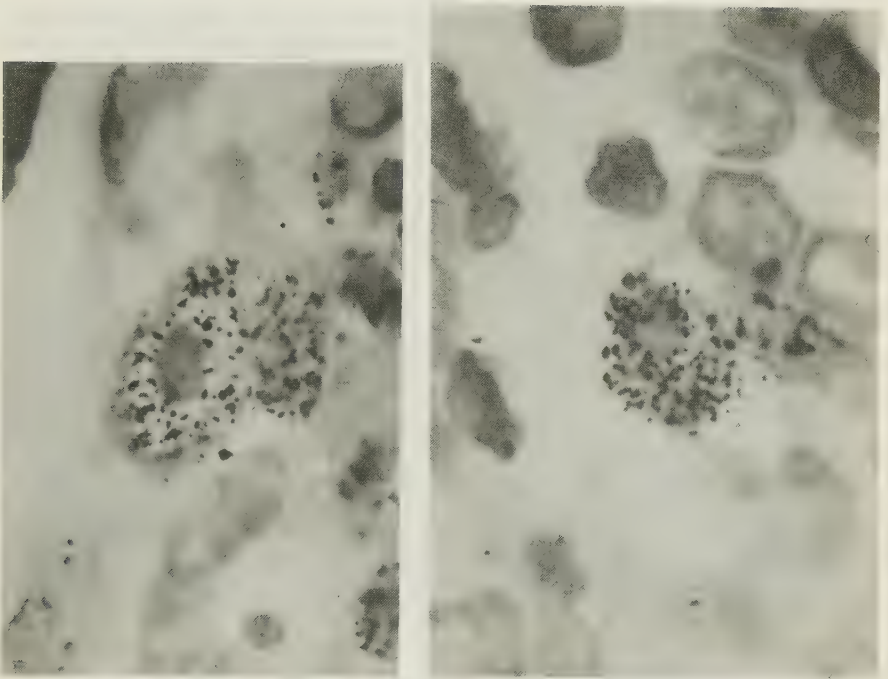


Abb. 1. Autoradiogramm von Zellen aus einem nichtverhornenden Pflasterzellcarcinom des Bronchus, 30 Minuten nach Inkubation mit ^3H -Thymidin. Ausschliessliche Markierung des Zellkerns mit Aussparung des Nucleolus. (HE-Färbung, Emulsion Ilford G 5, Belichtungszeit: 10 Tage, Vergr. 1600 X.)

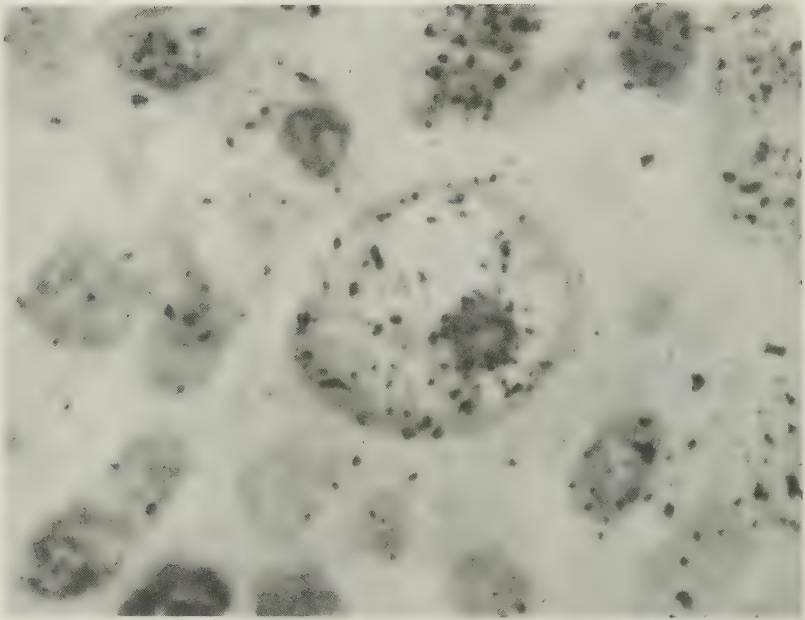


Abb. 2. Autoradiogramm von Zellen eines nichtverhornenden Pflasterzellcarcinoms 30 Minuten nach Inkubation mit ^3H -Cytidin. Fast ausschliessliche Markierung des Zellkerns, grösste Silberkorndichte über dem Nucleolus. (Färbung, Vergr. Bel.-Zeit und Emulsion wie in Abb. 1.)

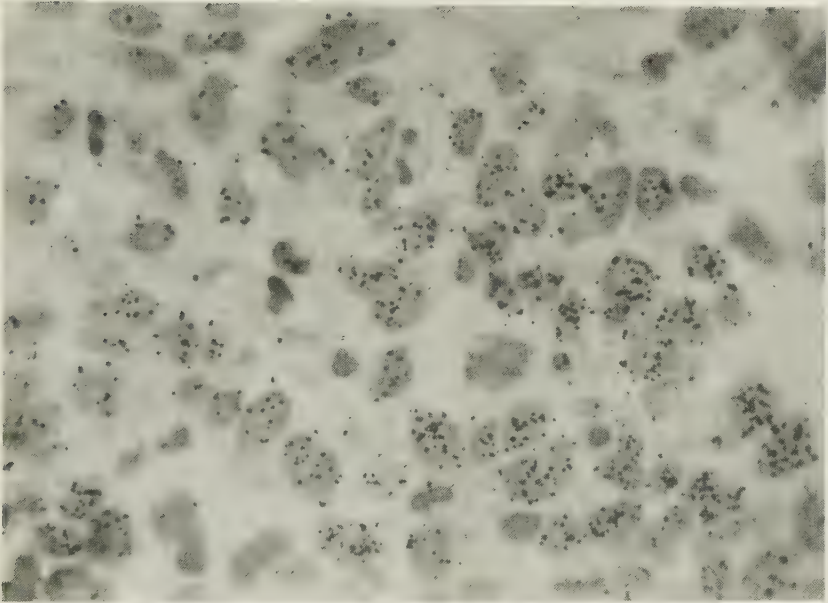


Abb. 3. Autoradiogramm aus einem nichtverhornenden Pflasterzellcarcinom des Bronchus 30 Minuten nach Inkubation mit ³H-Cytidin. Deutliche Markierung aller Zellkerne mit Ausnahme der Meta- und Anaphasen. (HE-Färbung, Emulsion Ilford G 5, Belichtungszeit: 10 Tage, Vergr. 400 X.)

Im unveränderten mehrreihigen Zylinderepithel grösserer und kleinerer Bronchien beobachtet man nach ^3H -Thymidininkubation nur einige wenige markierte Zellen. Es handelte sich hierbei stets um die sogenannten Ersatzzellen mit kleinen, chromatindichten Zellkernen, die breitbasig der Basalmembran aufsitzen. Soweit der Markierungsindex bestimmt werden konnte, lag er stets unter 5 %. Im lockeren Bindegewebe wurden immer einige markierte Zellen gefunden, die entweder als Fibroblasten oder als nicht näher zu identifizierende monozytäre Zellelemente angesprochen wurden. Ausserdem konnten in praktisch jedem untersuchten Gewebsschnitt einige markierte Gefässendothelien oder Adventitiazellen nachgewiesen werden.

Sehr unterschiedlich war die Zahl markierter Zellen im regeneratorschen Übergangsepithel und im metaplastischen Pflasterepithel bei chronischer Bronchitis. Neben Fällen, in denen grössere Streifen des dunkelkernigen mehrschichtigen Übergangsepithels nur einige wenige markierte Zellkerne in unteren Zellagen enthielten, wurden solche beobachtet, bei denen zahlreiche, oft dicht nebeneinanderliegende markierte Zellen nachweisbar waren (Abb. 4). Im histologischen Bild boten diese unterschiedlich markierten Übergangsepithelien keinerlei Unterschiede. Mitosen konnten wir praktisch nie auffinden. Die gleiche Beobachtung gilt für das metaplastisch zu Pflasterepithel umgewandelte Bronchialepithel. Hierbei waren jedoch bei intensiver Durchmusterung der Präparate einige wenige Mitosefiguren in der Basalzellschicht aufzufinden.

Sowohl in den von uns untersuchten verhornenden und nicht-verhornenden als auch in kleinzelligen Bronchialcarcinomen wurden zahlreiche markierte Zellen aufgefunden. Soweit Zellzählungen möglich waren, lag der Markierungsindex im kleinzelligen Bronchialcarcinom meist höher als in Pflaster-

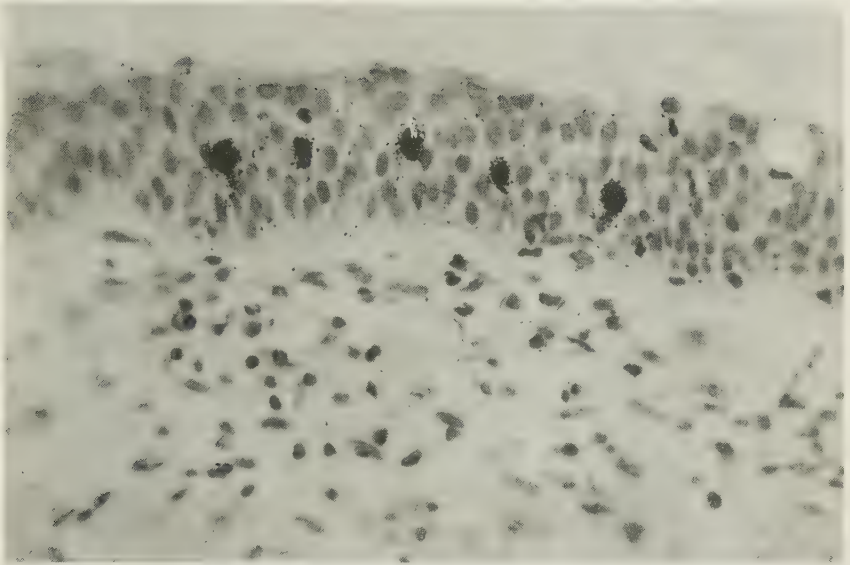


Abb. 4. Autoradiogramm eines regenerativen Übergangsepithels des Bronchus 30 Minuten nach Inkubation mit ^3H -Thymidin. Zahlreiche DNS-synthetisierende Zellkerne in mittleren Zellschichten, keine Mitosen nachweisbar. (HE-Färbung, Emulsion Ilford G 5, Belichtungszeit: 10 Tage, Vergr. 250 X.)

zellcarcinomen unterschiedlicher Differenzierungshöhe. Wir konnten jedoch auch nicht verhornende Pflasterzellcarcinome untersuchen, die gleiche oder sogar höhere Markierungsindizes aufwiesen als kleinzellige Bronchialcarcinome. Während in Pflasterzellcarcinomen mühelos zahlreiche, z.T. atypische Mitosen nachweisbar waren, war ein Mitosenachweis in kleinzelligen Carcinomen schwierig und oft unmöglich.

Besonders interessant und bedeutungsvoll scheint uns die Beobachtung zu sein, dass bei Katheterbiopsien, bei denen oft nur kleine, unzusammenhängende Zellverbände zur histologischen Untersuchung gelangten, besonders günstige Einbausergebnisse erhalten wurden. In mehreren Fällen, bei denen durch zusätzliche Probeexcision das Vorliegen eines kleinzelligen Bronchialcarcinoms gesichert werden konnte, fanden wir im Material der Katheterbiopsie dunkelkernige Zellverbände, in denen zahlreiche Zellkerne markiert waren (Abb. 5). In anderen Fällen, in denen sicher kein Carcinom vorlag, wohl aber chronische Bronchitiden mit regenerativem Übergangsepithel, fanden wir in den Katheterbiopsien ebenfalls Zellverbände kleiner dunkelkerniger Zellelemente, die histologisch nicht von denen des kleinzelligen Bronchialcarcinoms unterscheidbar waren, die aber keine markierten Zellen erkennen liessen.

Bei den Inkubationsversuchen mit ^3H -Cytidin war in den Zellen des normalen Bronchialepithels nur ein geringer Einbau erkennbar. Sowohl im regenerativem Übergangsepithel als auch im metaplastischen Pflasterepithel fand sich eine deutliche Steigerung der Einbauaktivität im Vergleich zum normalen Epithel und zur Umgebung. Während im regelrecht geschichteten Pflasterepithel die Silberkorndichte mit zunehmender Schichthöhe im Epithel abnahm, zeigte das

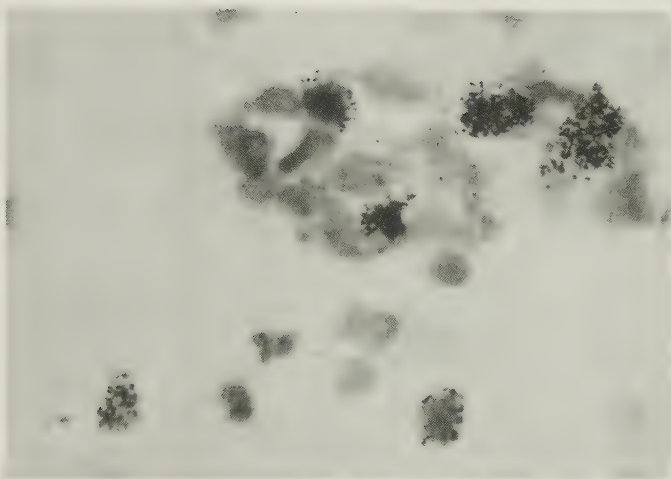


Abb. 5. Autoradiogramme von dunkelkernigen Zellgruppen aus einer Katheterbiopsie bei nachgewiesenem kleinzelligem Bronchialcarcinom 30 Minuten nach Inkubation in ^3H -Thymidin. Zahlreiche DNS-synthesisierende Zellen ohne nachweisbare Mitosen. (HE-Färbung, Emulsion G 5, Belichtungszeit: 10 Tage, Vergr. 400 X.)

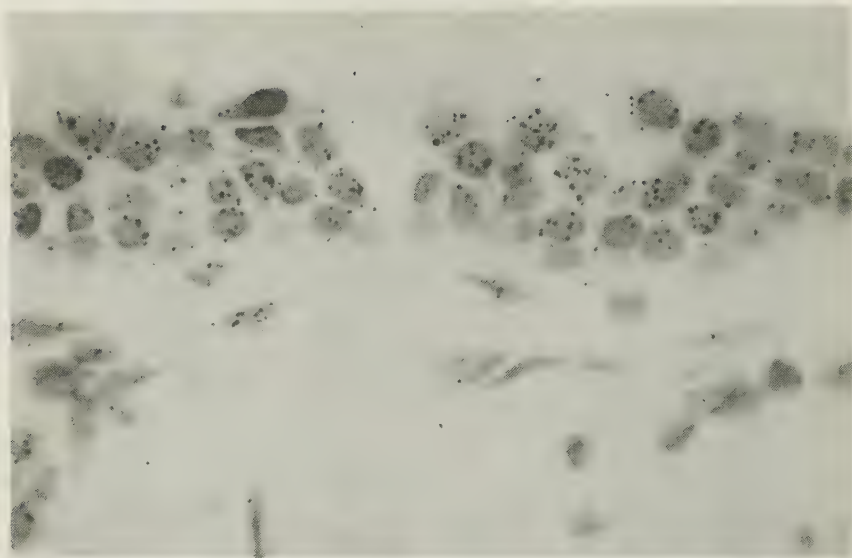


Abb. 6. Autoradiogramm des mehrschichtigen Übergangsepithels im Bronchus 30 Minuten nach Inkubation mit ³H-Cytidin. Lebhaftige Inkorporation von Cytidin in RNS in allen Zellschichten. (Färbung, Vergr., Bel.-Zeit und Emulsion wie in Abb. 5.)

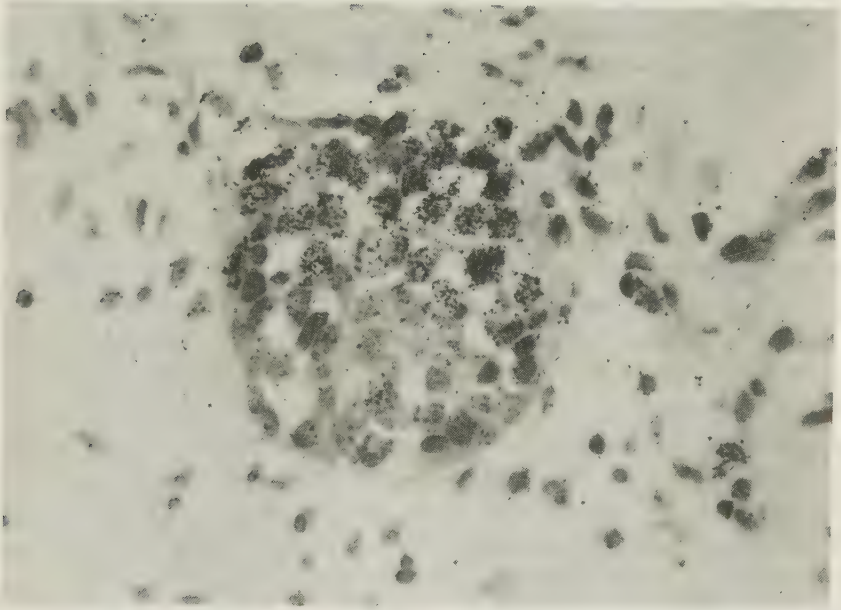


Abb. 7. Autoradiogramm eines Zellverbandes bei kleinzelligem Bronchialcarcinom 30 Minuten nach Inkubation mit ^3H -Cytidin. Starke RNS-Neubildung in Carcinomzellen, geringere in mesenchymalen Zellelementen der Umgebung. Abnahme der Einbauintensität mit zunehmender Entfernung vom Gewebsrand (oben). (HE-Färbung, Emulsion G 5, Belichtungszeit: 10 Tage, Vergr. 320 X.)

regeneratorische Übergangsepithel keine Unterschiede zwischen basalen und oberflächlich gelegenen Zellschichten (Abb. 6). In allen untersuchten Carcinomen (Abb. 7) lag die Einbauintensität pro Zellkern weit höher als im normalen Bronchialepithel und im regeneratorischen Übergangsepithel.

Besprechung der Ergebnisse:

Sowohl das an Hand einiger Beispiele besprochene Einbaumuster der untersuchten Gewebe und Zellen nach Inkubation mit ^3H -Thymidin und ^3H -Cytidin als auch das an anderer Stelle mitgeteilte Ergebnis von Vergleichsuntersuchungen (OEHLERT, LESCH u. DOERMER (1963) dürfen als Beweis dafür gelten, dass der autoradiographischen Schwärzung in unseren Inkubationsversuchen ein Einbau von ^3H -Thymidin in DNS, bzw. eine Inkorporation von ^3H -Cytidin in RNS zugrunde liegt. Wir fassen somit mit unseren Versuchen die im Überlebenden menschlichen Gewebe auslaufenden Stoffwechselvorgänge, die uns Hinweise auf die Verhältnisse in vivo liefern können. Die von uns angewandte Technik mit kurzer Inkubationszeit und schonender Behandlung der inkubierten Gewebe sowie mit einem verhältnismässig indifferenten Inkubationsmedium bietet unseres Erachtens bessere Aussagemöglichkeiten als die von anderen Autoren angegebenen Verfahren, bei denen lange Inkubationszeiten, Kulturmedien wie für Gewebekulturen, bzw. nach Einfrieren dünn geschnittene Gewebsscheiben verwandt werden (WOLBERG u. BROWN (1962); VEENEMA, FINGERHUT u. GIRGIS (1964).

Schwierigkeiten in der Auswertung der Ergebnisse bereitet die Tatsache, dass nur in einem Teil der untersuchten Fälle (etwa 40 %) so grosse Gewebsanteile in engen Kontakt mit

dem Inkubationsmedium kommen, dass quantitative Aussagen über den Markierungsindex durch Zellzählungen möglich sind. Derartige Bestimmungen sind dann von Interesse, wenn aus dem Markierungsindex auf die Wachstumsgeschwindigkeit, d.h. die mittlere Lebensdauer, der untersuchten Zellpopulationen geschlossen werden soll. Ausserdem werden immer in einem Teil der Fälle negative Autoradiogramme erhalten werden, die nicht auf einen Einbaustopp oder geringen Stoffwechsel der untersuchten Gewebe, sondern auf ungünstigen Anschnitt oder falsche Auswahl der Gewebsschnitte zurückzuführen sind. Durch völliges Aufschneiden der inkubierten Gewebe in Serien und sorgfältiges Einblocken der Gewebsschnitte wird man jedoch die Anzahl negativer Autoradiogramme gering halten können.

Trotz dieser genannten Einschränkungen dürfte die Inkubationstechnik in Verbindung mit der autoradiographischen Untersuchung doch dazu beitragen, einige den Kliniker und Pathologen interessierende Fragen einer Beantwortung näher zu bringen.

Die Veränderungen des Bronchialepithels bei chronischen Bronchitiden lassen sich allein auf Grund ihrer histologischen Besonderheiten nur schwer hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Entstehung von Bronchialcarcinomen beurteilen.

Sowohl das regeneratorsche Übergangsepithel als auch das metaplastische Pflasterepithel des Bronchialbaumes können unter günstigen Bedingungen wieder zum typischen Bronchialepithel ausdifferenzieren (GARSCHIN (1936) ; KAHLAU (1954); OTTO (1957 ; STRUWE (1960). Auf der anderen Seite müssen wir annehmen, dass beide Epitheltypen als mögliche Vorstufen eines Bronchialcarcinoms zu gelten haben. Bei der Bewertung des metaplastischen Pflasterepithels

stehen uns die gleichen Parameter zur Verfügung wie bei der Beurteilung des Pflasterepithels der Portio, also Epithelhöhe, Ausdifferenzierung der einzelnen Zellelemente, Regelmässigkeit der Schichtung, Kern-Plasma-Relation der Zellen und Anzahl und Lokalisation der histologisch nachweisbaren Mitosen. Hier erhalten wir durch die autoradiographische Untersuchung des DNS- und RNS-Stoffwechsels in Überlebenden Geweben mit der Anzahl und Lokalisation DNS-synthetisierender Zellen und mit Einbaumuster und Einbaugrösse in RNS mehrere zusätzliche Messwerte, die für die Beurteilung der Dignität des entsprechenden Gewebes von Bedeutung sind.

Das regeneratorsche Übergangsepithel dagegen bietet in den für die Routinehistologie angewandten Färbungen ein sehr gleichförmiges histologisches Bild. Aussagen über die Proliferationsaktivität dieses Epithels stossen auf grösste Schwierigkeiten, da es praktisch nie gelingt, Mitosen nachzuweisen. Die Autoradiogramme zahlreicher Fälle ergaben nun sowohl hinsichtlich der Zahl und Lokalisation DNS-synthetisierender Zellen als auch hinsichtlich der Grösse der RNS-Synthese erhebliche Unterschiede zwischen den untersuchten Übergangsepithelien, die sich im histologischen Bild nicht fassen liessen. Zum Teil bestand eine Relation zwischen dem Ausmass der entzündlichen Veränderungen im lockeren Bindegewebe unter dem Epithel und der Steigerung des DNS- und RNS-Stoffwechsels. In solchen Fällen führten wir die Stoffwechselsteigerung im Epithel auf die Entzündung im darunter liegenden Gewebe zurück. In anderen Fällen jedoch bestanden eine erhebliche Proliferationsaktivität und Stoffwechselsteigerung im Übergangsepithel, ohne dass entsprechende entzündliche Veränderungen in der Umgebung nachweisbar waren. Hier musste demnach die Wachstums- und Stoffwechsel-

steigerung im Epithel selbst begründet liegen. Wir sind uns der Tatsache bewusst, dass hieraus allein eine bindende Aussage über die Dignität dieser Epithelveränderung nicht abgeleitet werden kann. Die sorgfältige klinische Überwachung von Patienten, bei denen derartige Veränderungen beobachtet wurden, könnte jedoch zu einer besseren Bewertung solcher Veränderungen führen und unsere Kenntnisse über die Vorstadien des Bronchialcarcinoms erweitern.

Für die Beurteilung der Wachstumsgeschwindigkeit der aus dem Gewebsschnitt diagnostizierten Bronchialcarcinome stehen uns einmal der Differenzierungsgrad und zum anderen ihre Proliferationsaktivität, gemessen an der Mitosezahl, zur Verfügung. Im kleinzelligen Bronchialcarcinom gelingt es jedoch nur mit Mühe, Mitosen nachzuweisen, deren Anzahl fast stets geringer als im Pflasterzellcarcinom ist. Hierfür mag einmal eine sehr kurze Mitosezeit verantwortlich sein, zum anderen die grosse Empfindlichkeit der Carcinomzellen gegenüber Quetschungen und anderen äusseren Einwirkungen. Ausserdem müssen wir annehmen, dass ein Teil der bei der Gewebsentnahme in der Mitosephase sich befindenden Zellen noch vor der Gewebsfixation ihre Mitose vollenden und dann nicht mehr nachweisbar sind. In unseren autoradiographischen Untersuchungen fanden wir in allen kleinzelligen Bronchialcarcinomen einen sehr grossen ^3H -Thymidin-Markierungsindex und eine grosse Einbauintensität für ^3H -Cytidin. Bei der in diesen Carcinomen auffallend homogenen Kerngrösse und der geringen Anzahl polyploider Zellkerne müssen wir annehmen, dass der DNS-Synthese fast stets eine Mitose folgt, dass also der Markierungsindex der Proliferationsrate proportional ist. Anders liegen die Verhältnisse beim Pflasterzellcarcinom. Zwar beobachtet man auch hier vereinzelt hohe Markierungsindices, die zum Teil über den für kleinzellige Carcinome ermittelten Werten liegen. Bei der grossen Anzahl polyploider Zellkerne müssen wir jedoch annehmen, dass ein Teil der DNS-synthesisierenden Zellen nicht abschliessend eine Teilung durch-

machen, sondern polyploidisieren. In solchen Fällen würde demnach der Markierungsindex nicht unmittelbar auf die Wachstumspotenz des entsprechenden Tumors schliessen lassen. Immerhin können wir aufgrund des bisher vorliegenden Untersuchungsergebnisses feststellen, dass mittels der Inkubationsmethode Aussagen über die Wachstumsgeschwindigkeit von Bronchialcarcinomen möglich sind, die weit über die durch Mitosezählungen ermittelten Aussagen hinausgehen.

Wir hatten bereits darauf hingewiesen, dass bei der Beurteilung von Katheterbiopsien sich dann Schwierigkeiten ergeben, wenn kleine Verbände dunkelkerniger Zellen nachweisbar sind, die sowohl von oberen Schichten eines regeneratorschen Übergangsepithels als auch aus einem kleinzelligen Bronchialcarcinom stammen können. Vergrössert wird die Schwierigkeit der Beurteilung noch dadurch, dass die Zellen häufig gequetscht und somit noch schlechter zu identifizieren sind. In mehreren Fällen konnten wir nachweisen, dass innerhalb derartiger Zellverbände, die mit Sicherheit von einem kleinzelligen Bronchialcarcinom herstammten, zahlreiche mit ^3H -Thymidin markierte Zellkerne lagen (s. Abb. 5). In Zellverbänden, die von einem regeneratorschen Übergangsepithel abgestreift worden waren, fanden sich dagegen nie markierte Zellkerne. In derartigen Fällen kann somit die autoradiographische Untersuchung nach Inkubation zur Klärung der Diagnose beitragen. Die relativ lange Zeit zwischen Gewebsentnahme und Fertigstellung des Autoradiogramms bedeutet natürlich eine Einschränkung des diagnostischen Wertes der Methode. Es besteht jedoch durch Erhöhung der Aktivitätskonzentration im Inkubationsmedium und durch die Inkubation von Ausstrichpräparaten von Katheterbiopsien die Möglichkeit, die Zeitspanne zwischen Entnahme und autoradiographischer Untersuchung auf etwa 3 Tage zu verkürzen.

Fassen wir die Ergebnisse unserer bisher durchgeführten Untersuchungen zusammen, so kommen wir hinsichtlich der Grenzen und Möglichkeiten der Inkubationsmethode am Biopsiematerial aus dem Bronchialbaum zu folgendem Schluss:

Die Grenzen der autoradiographischen Untersuchungstechnik an inkubierten menschlichen Geweben werden durch die verhältnismässig geringe Eindringtiefe des Inkubationsmediums in das zu untersuchende Gewebe gesteckt. Kleine Gewebsbröckel eignen sich besser als grössere, zusammenhängende Gewebsabschnitte. Hierdurch werden sowohl die qualitative als auch die quantitative Auswertung der Autoradiogramme erschwert und die Aussagemöglichkeit eingeschränkt.

Trotz der genannten Nachteile sind von systematisch durchgeführten autoradiographischen Stoffwechseluntersuchungen bei chronischen Bronchitiden Aufschlüsse über die Vorstadien des Bronchialcarcinoms zu erwarten. Hierbei wird es aufgrund der Einbauergebnisse für ^3H -Thymidin und ^3H -Cytidin möglich sein, die biologische Wertigkeit des sogenannten regenerativen Übergangsepithels und der Pflasterzellmetaplasie besser zu definieren. Dazu ist jedoch eine systematische klinische Überwachung und Nachuntersuchung der entsprechenden Patienten erforderlich.

Die Ergebnisse autoradiographischer Untersuchungen des DNS- und RNS-Stoffwechsels in Bronchialcarcinomen ermöglichen Aussagen über die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren, die mittels Mitosezählungen nicht erreicht werden können.

Die beschriebene Untersuchungsmethode kann vor allem bei der histologischen Beurteilung von Katheterbiopsien und evtl. auch von Ausstrichpräparaten von Spülflüssigkeit und Sputum erhebliche Bedeutung erlangen, wenn es gelingt, den Zeitraum zwischen Gewebsentnahme und histologischer Untersuchung ent-

sprechend zu verkürzen.

Voraussetzung für die Weiterentwicklung der Methode und ihren Wert ist in jedem Falle die enge Zusammenarbeit zwischen Klinikern und Pathologen.

Zusammenfassung:

Gewebsproben aus dem menschlichen Bronchialsystem wurden nach 30 Minuten Inkubation in Ringerlösung, der ^3H -Thymidin oder ^3H -Cytidin zugesetzt worden war, autoradiographisch untersucht. Das Einbaumuster der untersuchten Gewebe und Zellen entsprach in jeder Hinsicht dem, das nach parenteraler Injektion der beiden Nucleinsäurevorläufer im Tierversuch beobachtet wird.

Das Ergebnis der autoradiographischen Untersuchung von insgesamt 196 Gewebsproben bei 110 Patienten, die vor allem an chronischer Bronchitis und Bronchialcarcinom litten, wird dargestellt.

Ein Nachteil der beschriebenen Technik besteht in der begrenzten Eindringtiefe des Inkubationsmediums, wodurch Aussagemöglichkeiten nur für relativ kleine zusammenhängende Gewebsbezirke bestehen.

Die Untersuchung der Grösse und des Musters des DNS- und RNS-Stoffwechsels im regeneratorschen Übergangsepithel und im metaplastisch zu Pflasterepithel umgewandelten Bronchialepithel nach Inkubation mit Thymidin und Cytidin erlaubt Aussagen über die biologische Wertigkeit dieser Veränderungen, die mit der histologischen Untersuchung allein nicht möglich sind.

Die Bestimmung der Zahl der DNS-synthetisierenden Zellen in Carcinomen ist in der Lage, weitergehende Aufschlüsse über die Wachstumsgeschwindigkeit der entsprechenden Tumoren zu geben, als dies mit Hilfe von Mitosezählungen der Fall ist.

Die Inkubationsmethode in Verbindung mit der Autoradiographie kann in bestimmten Fällen ein wichtiges diagnostisches Hilfsmittel für den Pathologen bei der Tumordiagnostik aus Katheterbiopsiematerial sein.

Literatur:

- Garschin, W.G.: Über Differenzierungsvorgänge im Epithel der Luftwege bei Regeneration und entzündlicher Proliferation.
Frankf. Z. Path. 49: 121 (1936).
- Fettig, O., W. Oehlert: Autoradiographische Untersuchungen der DNS- und Eiweiss-Neubildung im gynäkologischen Untersuchungsmaterial.
Arch. Gynäkol. 199: 649 (1964).
- Kahlau, G.: Der Lungenkrebs.
Ergebn. allg. Path. 37:258 (1954).
- Lesch, R., W. Schiessle, W. Oehlert: Autoradiographische Untersuchungen zur DNS-Synthese an menschlichem Excisionsmaterial aus dem Bronchialbaum.
Beitr. path. Anat. 129: 295 (1963-64).
- Oehlert, W., P. Doermer, R. Lesch: Autoradiographische Untersuchungen über die DNS-Synthese im überlebenden Tumorgewebe des Menschen.
Beitr. path. Anat. 128: 467 (1963).
- Oehlert, W., R. Lesch, P. Doermer: Autoradiographische Untersuchungen des DNS- und RNS-Stoffwechsels an menschlichem Excisionsmaterial.
Naturwissenschaften 50: 713 (1963).
- Otto, H.: Die Bewertung des metaplastischen Bronchialepithelregenerates. Beitr. path. Anat. 117: 397 (1957).
- Struwe, F.E.: Über Metaplasien der Bronchialschleimhaut bei Fällen von Bronchialcarcinom.
Beitr. path. Anat. 122:57 (1960).

Veenema, R.J., B. Fingerhut, A.S. Girgis: A possible guide
to therapy of bladder tumors.
J. Urol. (Baltimore) 90: 736 (1963).

Wolberg, W.H., R.R. Brown: Autoradiographic studies of
in vitro incorporation of uridine
and thymidine by human tumor tissue.
Cancer Res. 22: 1113 (1962).

Lebenslauf.

Am 25.1.1939 wurde ich als Tochter des Berufssoldaten Alfons Ernst und seiner Ehefrau Morika, geb. Ludäscher in Stettin geboren.

Die Flucht führte unsere Familie 1944 mit Zwischenstationen in Herbertshofen und Bliensbach in Bayern schliesslich nach Wertingen. In dieser bayerischen Kreisstadt besuchte ich bis 1951 die Volksschule.

Die Verlegung unseres Wohnsitzes nach Gersthofen-Augsburg ermöglichte mir 1951 den Eintritt in das Deutsche Gymnasium in St. Maria-Stern in Augsburg-Göggingen, wo ich am 17.7. 1958 die Reifeprüfung ablegte. Nach einem Semester Jurastudium an der Universität München entschloss ich mich 1959 zum medizinischen Studium. Am 24.10.1960 absolvierte ich das Vorphysikum und am 22.2.1963 das Physikum an der Universität München. Im Sommer 1963 immatrikulierte ich mich für die klinischen Semester an der Universität Freiburg.

Im Herbst verheiratete ich mich mit dem Kandidaten der Medizin Leo Reich.

Nach dem Wintersemester 1965/66 legte ich das medizinische Staatsexamen an der Universität Freiburg mit Erfolg ab.

